

# Bijelim vinom potaknuta endotel-ovisna dilatacija kod Sprague-Dawley štakora

---

**Stepančević, Stefan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:213579>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Stefan Štepančević**

**BIJELIM VINOM POTAKNUTA  
ENDOTEL-OVISNA DILATACIJA KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Stefan Stepančević**

**BIJELIM VINOM POTAKNUTA  
ENDOTEL-OVISNA DILATACIJA KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren na Katedri za imunologiju i fiziologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević.

Rad ima 34 lista, 4 tablice i 13 slika.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Endotel-ovisna dilatacija.....	1
1.2. Vazodilatacijska svojstva vina.....	2
1.3. Utjecaj alkohola na kardiovaskularne bolesti.....	3
1.4. Slobodni radikali.....	4
1.5. Polifenoli u vinu.....	5
1.6. Flavonoidi.....	6
1.7. Kvercetin.....	7
2. HIPOTEZA.....	9
3. CILJ.....	10
4. MATERIJALI I METODE.....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Ispitanici.....	11
4.3. Metode.....	12
4.3.1. Uzorci bijelog vina.....	12
4.3.2. Nanošenje aortnih prstenova u kupelj.....	13
4.3.3. Ekvilibracija.....	15
4.3.4. Dodavanje noradrenalina i acetilkolina.....	16
4.3.5. Dodavanje uzoraka bijelog vina.....	17
4.3.6. Dodavanje L-NAME.....	17
4.3.7. Spektrofotometrijsko određivanje sastava fenola, flavonoida i antioksidativnog	

statusa .....	18
4.4 Statističke metode.....	19
5. REZULTATI.....	20
5.1. Istraživanja na izoliranim aortnim prstenovima.....	20
5.2. Predtretman aortnih prstenova s L-NAME.....	20
5.3. Analiza sastava bijelog vina .....	23
5.3.1. Biokemijski parametri sastava bijelog vina.....	23
5.3.2. Ukupni sadržaj fenola uzoraka bijelog vina.....	24
5.3.3. Antioksidativni kapacitet bijelog vina.....	25
6. RASPRAVA.....	27
7. ZAKLJUČAK.....	29
8. SAŽETAK.....	30
9. SUMMARY.....	31
10. LITERATURA.....	32
11. ŽIVOTOPIS.....	34

## Popis kratica

**apoB** - apolipoprotein B

**cGMP** (engl. *guanosine-cyclic monophosphate*) - ciklički gvanozin monofosfat

**COX-1** (engl. *cyclooxygenase 1*)- ciklooksigenaza-1

**COX-2** (engl. *cyclooxygenase 2*) – ciklooksigenaza-2

**CRP** (engl. *c-reactive protein*) – C-reaktivni protein

**EDHF** (engl. *endothelial-derived hyperpolarization factors*) - endotelni hiperpolarizirajući čimbenici

**EDRF** (engl. *endothelium-derived relaxing factors*) - endotelni čimbenik relaksacije

**FRAP** (engl. *ferric reducing antioxidant power*) - antioksidativna moć redukcije feri iona

**HDL** (engl. *high density lipoprotein*) - lipoprotein visoke gustoće

**HPLC** (engl. *High-performance liquid chromatography*) - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

**iNOS** (engl. *inducible nitric oxide synthase*) - inducibilna sintaza dušikovog oksida

**LDL** (engl. *low density lipoprotein*) - lipoproteina niske gustoće

**NF-κB** (engl. *nuclear factor kappa B*) - jezgrin čimbenik kapa B

**NO** (engl. *nitric oxide*) – dušikov oksid

**PAR** (engl. *plasma antioxidant reserve*) – antioksidativne rezerve plazme

**ROS** (engl. *reactive oxygen species*) – reaktivne kisikove tvari

**UV** (engl. *ultraviolet*) – ultraljubičasti

## 1. UVOD

### 1.1. Endotel-ovisna dilatacija

Endotel je dinamičan organ koji u potpunosti oblaže vaskularni sustav, a karakterizira ga izrazita sposobnost prilagodbe. Težine je oko jedan kilogram, a sadrži između 1 i  $6 \times 10^{13}$  endotelnih stanica koja se nalaze u sloju debljine od 0,5 do 1  $\mu\text{m}$  (1). Endotelne stanice imaju sposobnost prepoznavanja i prilagodbe na humoralne, mehaničke i hemodinamičke promjene. Endotel ima vrlo bitnu ulogu u: kontroli vaskularnog tonusa, modulaciji migracije leukocita, inhibiciji agregacije trombocita, moduliranju propusnosti vaskularne stijenke i regulaciji proliferacije stanica glatkih mišića. Najvažnije svojstvo endotela je sposobnost vazodilatacije krvnih žila kao odgovor na naglu promjenu protoka (žilni stres) (1). U slučajevima oštećenog endotela dolazi do endotelne disfunkcije. Endotelna disfunkcija je stanje koje može dovesti do neprimjerene endotelne aktivacije, koja je karakteristična za brojna patološka stanja, kao što su: kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, dijabetes i upalne bolesti. Endotelnom disfunkcijom dolazi do aktivacije endotelnih stanica koje ostvaruju proupalna, protrombotska i vazokonstriksijska svojstva (1). Ha SK i suradnici (2) istraživali su vazorelaksacijske učinke dealkoholiziranog vina dobivenog od divljeg grožđa na izoliranoj torakalnoj aorti divljeg štakora te su zaključili kako prah dealkoholiziranog vina inducira relaksaciju aortnog prstena koji je prethodno prekontraheiran norepinefrinom. Dokazano je kako vazorelaksacijsko svojstvo dealkoholiziranog vina ovisi o endotelu zbog endotelne sposobnosti otpuštanja endotelnih čimbenika relaksacije (eng. *endothelium-derived relaxing factors*; EDRF) koji dovode do vazorelaksacije vaskularnih glatkih mišića i održavanja vaskularnog tonusa. Najvažniji EDRF su dušikov oksid (engl. *nitric oxide*; NO), prostaciklin i endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (eng. *endothelial-derived hyperpolarization factors*; EDHF). NO nastaje metabolizmom L-arginina, NO sintetazom endotelnih stanica te sudjeluje u opuštanju vaskularnih glatkih mišića. NO se otpušta iz endotelnih stanica kao odgovor na žilni stres pod djelovanjem spojeva kao što su: acetilkolin, trombin i bradikinin. Vazodilatacija je najvažnije svojstvo NO-a, a osim toga ima još neka važna svojstva, kao što su: adhezija i migracija leukocita u arterijsku stijenku, sprječavanje agregacije trombocita i inhibicija proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica (1). Prostaciklin je spoj kojega sintetizira ciklooksigenaza-1 (eng. *cyclooxygenase 1*; COX-1) iz arahidonske kiseline. Prostaciklin povisuje koncentraciju cAMP-a u glatkim mišićnim stanicama i trombocitima i na taj način inhibira djelovanje trombocita te ostvaruje vazodilatacijsko djelovanje



otpuštanjem različitih antagonista. EDHF je kompezatorni mehanizam endotel-ovisne dilatacije, a aktivira se u slučajevima kada NO nije dostupan (1).

## 1.2. Vazodilatacijska svojstva vina

Prethodna istraživanja pokazala su kako vina imaju koristan učinak na miokard te kako smanjuju incidenciju smrtnosti od infarkta miokarda. Koristan učinak vina ostvaraju zahvaljujući svojim vazodilatatornim svojstvima (3). U istraživanju Flesch M i suradnika (3) dokazano je kako samo talijanska i francuska crna vina proizvedena u bačvi smanjuju napetost vaskularnih prstenova i povećavaju sadržaj vaskularnog cikličkog gvanozin monofosfata (engl. *guanosine-cyclic monophosphate*; cGMP). Crna vina proizvedena u bačvi se dobivaju postupkom prešanja grozdova i fermentacije s peteljka grožđa, a vino dozrijeva u novim hrastovim bačvama. Bijela vina, crna vina proizvedena različitim tehnikama koje nisu uključivale proizvodnju u bačvi te etanol nisu utjecali na vaskularnu napetost i sadržaj cGMP-a, iz čega je zaključeno kako su vazodilatacijski učinci ovisni o endotelu specifični za crna vina proizvedena u bačvi zbog visokog udjela fenolnih tvari koje oni sadrže. Komercijalno dostupna bijela vina imaju znatno slabiju sposobnost vazodilatacije i znatno niži udio polifenola u odnosu na crna vina (4, 5). Dokazano je i kako konzumacija crnog vina ima znatno bolji učinak na prevenciju kardiovaskularnih bolesti u odnosu na druga alkoholna pića (6). U istraživanju Fitzpatricka i suradnika (4) dokazano je da jedno od ispitivanih bijelih vina ostvaruje vazodilatacijski učinak, koji je znatno manji od vazodilatacijskih učinaka crnih vina. Na osnovu ovog istraživanja zaključeno je da bijela vina sadrže određene vazodilatacijske tvari, a njihova koncentracija ovisi o vrsti grožđa korištenom za dobivanje vina te o postupcima s grožđem prije fermentacije. Dokazano je da kvercetin i taninska kiselina, spojevi koji su prisutni u kožici grožđa, izazivaju opuštanje glatkih mišića aortnih prstenova ovisno o endotelu, dok resveratrol i malvidin nisu opustili aortne prstenove. Dokazano je i kako ekstrakti vina povećavaju razinu cGMP-a u vaskularnom tkivu te da je vazorelaksacija izazvana produktima grožđa posredovana cGMP-NO putem, pri čemu postoji vjerojatnost smanjenja incidencije koronarne bolesti.

### 1.3. Utjecaj alkohola na kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti jedan su od vodećih uzroka smrtnosti i invalidnosti u razvijenim zemljama (7). Brojna istraživanja pokazala su povezanost između konzumacije alkohola i razvoja hipertenzije, srčanog udara, moždanog udara, koronarnih bolesti, kardiomiopatije i periferne arterijske bolesti (7-10). Bihevioralne, genetske i biološke razlike između pojedinaca mogu uzrokovati različite odgovore na alkohol, no najbitnijim čimbenikom za razvoj bolesti smatra se dnevna doza alkohola koju pojedinac konzumira. Niska do umjerena doza alkohola (manje od 15 grama po danu) može zaštitno djelovati na čimbenike rizika koji uzrokuju aterosklerozu i upalu, čime se znatno smanjuje rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (7). Istraživanje Klatsky AL i suradnika (8) dokazalo je kako ispitanici koji konzumiraju alkohol u većim dozama imaju veći rizik i za razvoj nekardiovaskularnih bolesti, kao što su, prije svega, ciroza jetre i karcinomi. Žene i mlađi ispitanici imali su veći rizik za razvoj smrtnih bolesti, dok su ispitanici koji su konzumirali alkohol u blagim dozama imali niži rizik za smrtnost od kardiovaskularnih bolesti. Unatoč brojnim pozitivnim učincima koje konzumacija alkohola u malim dozama može imati, treba uzeti u obzir i sve negativne fiziološke učinke koji se mogu javiti, a to su najčešće: oksidativni stres, poremećaji cirkulacije, upalni odgovor, programirana stanična smrt i mitohondrijska disfunkcija (7). Učinci konzumacije alkohola na upalne procese su dvostruki. Niže doze alkohola dovode do smanjenja upale, što se može potvrditi sniženim razinama C–reaktivnog proteina (engl. *c-reactive protein*; CRP) i interleukina. S druge strane, više doze alkohola izazivaju oksidativni stres i povišene razine upalnih markera (11). Dugotrajna konzumacija alkohola smanjuje ekspresiju i sintezu proteina miokarda te ubrzava razgradnju proteina miokarda, zbog čega dolazi do poremećene funkcije miokarda: poremećaj kontrakcije miokarda i poremećaj opuštanja srčanih stijenki (11). Konzumacija alkohola ima značajan utjecaj na profil lipida. Visoke razine triglicerida u krvi su povezane s aterosklerozom i povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara. Unos alkohola u niskim dozama povećava razinu lipoproteina visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*; HDL), prije svega HDL2, a u isto vrijeme smanjuje razinu lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*; LDL), ukupnog kolesterola, apolipoproteina B (apoB) i triglicerida. Vu KN i suradnici (12) dokazali su nelinearan učinak konzumacije alkohola na trigliceride, ukupni kolesterol, HDL, LDL i apoB, s najvećim učincima uočanim u trećoj kvartili konzumacije alkohola. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je kako konzumacija alkohola može imati najveću korist u rasponu od

niske do srednje doze. Konzumacijom alkohola dolazi do povećane proizvodnje HDL-a u jetri, a povećanjem razine velikih čestica HDL2 ostvaraju se kardioprotektivni učinak.

#### 1.4. Slobodni radikali

Slobodni radikali imaju dvojnju ulogu s obzirom da mogu biti i korisni i toksični za ljudski organizam. Mogu ih proizvesti endogene reakcije (aktivacija imunoloških stanica, mentalni stres, upala, ishemija, infekcija, rak, starenje) ili vanjski (egzogeni) izvori (zagađenje okoliša, dim cigarete, alkohol, teški metali, radijacija i lijekovi) (13). Proizvodnja slobodnih radikala u fiziološki niskim koncentracijama vrlo je bitna za borbu protiv nepovoljnog okoliša, a fagociti su zaslužni za oslobađanje slobodnih radikala koji uništavaju patogene mikrobe. NO, superoksidni anion i reaktivne kisikove tvari (engl. *reactive oxygen species*; ROS) imaju bitnu ulogu kao posrednici u staničnoj signalizaciji. NO i ROS reguliraju vaskularni tonus, napetost kisika u kontroli ventilacije i proizvodnju eritropoetina. (13) Slobodni radikali su vrlo bitni za rad štitnjače te proizvodnje hormona štitnjače, proizvodnju prostaglandina, imaju bitnu ulogu u fagocitozi, ostvaraju baktericidni učinak te sudjeluju u proizvodnji energije na respiracijskom lancu (14). Slobodni radikali pri prekomjernoj proizvodnji mijenjaju staničnu funkciju i izazivaju kronične i degenerativne bolesti, a također su i jedan od ključnih čimbenika za razvoj hipertenzije, vaskularnih poremećaja i metaboličkog sindroma (15). Slobodni radikali djeluju na središnji živčani sustav gdje mogu uzrokovati moždani udar, Alzheimerovu bolest i depresiju. Također djeluju na kardiovaskularni sustav gdje uzrokuju hipertenziju, aterosklerozu i kardiomiopatiju. U respiratornom sustavu uzrokuju astmu. Djelovanje slobodnih radikala je vidljivo i na metaboličkom i skeletnom sustavu te sustavu za izlučivanje (15). Jedna od najčešćih vrsta slobodnih radikala su ROS, koje imaju nespareni elektron u vanjskoj orbitali te su karakteristične po svojoj izrazitoj nestabilnosti i reaktivnosti, a imaju i vrlo kratak životni vijek. ROS-u pripadaju hidroksilni radikali, hidroperoksidni radikali, superoksidni radikali i neradikali kao što su: singlet kisika, vodikov peroksid i hipoklorit. ROS u organizmu mogu nastati: aktivnošću enzima (superoksid dismutaza, mijeloperoksidaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i ksantin oksidaza) koji kataliziraju redukciju molekula kisika u vodikov peroksid ili superoksidni radikal, reakcijama autooksidacije, reakcijama na respiracijskom lancu unutrašnje membrane mitohondrija ili neutrofilnom aktivacijom za vrijeme upale (14). Ukoliko se preopterećenje slobodnim radikalima ne može postupno uništiti, oni se nakupljaju i uzrokuju razvoj

oksidativnog stresa. Oksidativni stres ima bitnu ulogu u nastanku kroničnih i degenerativnih bolesti, kao što su: rak, starenje, autoimuni poremećaji, reumatoidni artritis, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (13). Kao jedan od odgovora na oksidativni stres, ljudsko tijelo proizvodi antioksidanse (13). Antioksidansi su tvari koje inhibiraju reakcije oksidacije drugih molekula koje mogu proizvesti slobodne radikale. Antioksidansi mogu biti prirodni ili sintetski, a glavni zadatak im je poboljšati patološka stanja uzrokovana slobodnim radikalima. Vitamin A, vitamin C i vitamin E su prehrambeni antioksidansi koji se nalaze u voću i povrću, dok su flavonoidi antioksidansi koji se nalaze u biljkama te ostvaraju brojna antioksidativna svojstva (15).

### **1.5. Polifenoli u vinu**

Konsumacija crnog vina znatno smanjuje rizik za kardiovaskularne bolesti, a eksperimentalne studije su pokazale kako je glavni razlog kardioprotektivnog učinka crnog vina prisutnost velikog broja polifenolnih spojeva, kao što su: resveratrol, flavonoidi (katehin, epikatehin, kvercetin i antocijanin) i polimerni tanini (10). Crna vina imaju znatno višu razinu polifenolnih spojeva u odnosu na bijela vina, a glavni razlog je fermentacija kožica i sjemenki grožđa pri dobivanju crnog vina. Polifenoli su aktivni spojevi koji imaju antioksidativna i protuupalna svojstva pomoću kojih ostvaruju kardioprotektivni učinak (10). Polifenoli koji su netopivi i oni koji se ne mogu ekstrahirati klasičnim tehnikama ekstrakcije otapalima imaju brojna bioaktivna svojstva. Pokazano je kako oni ostaju u debelom crijevu dulje vrijeme, gdje se metaboliziraju crijevnom mikroflorom te stvaraju aktivne metabolite koji se učinkovitije apsorbiraju. Katabolizmom u crijevima dolazi do otpuštanja polifenolnih metabolita male molekularne mase koji se u plazmi zadržavaju između 3 i 4 dana nakon uzimanja povišenih koncentracija polifenola. Ovi metaboliti polifenola ostvaruju brojna protuupalna i antioksidativna svojstva (16). Duda-Chodak A i suradnici u svome istraživanju (17) dokazali su da polifenoli koje nalazimo u zelenom i crnom čaju mogu inhibirati rast štetnih bakterija i virusa, kao što su: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, virus hepatitisa C, HIV i *Candida*. Resveratrol je neflavonoidni polifenolni spoj koji ima značajna antioksidativna svojstva te je najučinkovitiji spoj crnoga vina za prevenciju koronarne bolesti. Resveratrol svoj kardioprotektivni učinak ostvaruje promjenom lipidnih profila, smanjenjem

inzulinske rezistencije i smanjenjem oksidativnog stresa. Građen je od dva fenolna prstena međusobno povezana stirenskom dvostrukom vezom, a postoji kao -cis i -trans izomer (10).

## 1.6. Flavonoidi

Flavonoidi su fitokemikalije biljnog porijekla koje imaju antioksidativna svojstva te čine više od 85 % fenolnih komponenti u crnom vinu (10). Flavonoidi dijele zajedničku strukturu koja sadrži C<sub>15</sub> fenil-benzopironsku osnovu te se sastoje od 3 prstena. Dva benzenska prstena (prsten A i prsten B) međusobno su povezana pomoću tri ugljikova atoma, dok se treći heterociklički prsten nalazi u središtu i sadrži kisik. Na osnovu strukturne građe, flavonoidi se dijele na: flavonole, flavone, flavanone, flavanolone, antocijanidine, izoflavone i kalkone (18). Prirodni flavonoidi mogu postojati u slobodnom obliku kao aglikoni ili kao glikozidi koji su kondenzirani s hidroksilnom skupinom različitih šećera, kao što su: glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza i glukuronid. Flavonoidi se u najvećoj mjeri nalaze u povrću, orašastim plodovima, sjemenkama, začinima, bilju, kakau i kožici grožđa. Ukupna koncentracija flavonoida varira između 150 mg/L i 650 mg/L, a posljednjih nekoliko desetljeća eksperimentalna i epidemiološka istraživanja potvrdila su bitan zaštitni učinak flavonoida na kardiovaskularne i degenerativne bolesti (10). Zbog svoje posebne kemijske strukture, flavonoidi ostvaraju razne fiziološke i biokemijske učinke na sisavce i druge vrste životinja. Najbitnija karakteristika flavonoida je jaka kemijska reaktivnost pomoću koje ostvaraju antioksidativne učinke na način da skupljaju slobodne radikale u organizmu. Flavonoidi inhibiraju LDL oksidaciju i agregaciju trombocita te djeluju kao vazodilatatori u krvnim žilama. Također, flavonoidi ostvaruju različite farmakološkijske aktivnosti, kao što su: inhibicija aktivnosti enzima, protutumorsko djelovanje, protuvirusno i protuupalno djelovanje (18). Za izolaciju flavonoida koriste se novije tehnike koje se zasnivaju na polarnosti, kiselosti, razlici molekularne težine i posebnim strukturama. Preporučena metoda za izolaciju flavonoida je kromatografija. Metode koje se mogu koristiti su: kromatografija na silika gelu, poliamidna kromatografija, kromatografija na polidekstranskom gelu, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*; HPLC) i molekularne imprinting tehnologije. Za detekciju flavonoida izoliranih HPLC metodom koriste se ultraljubičasti (engl. *ultraviolet*; UV) detektori zbog njihove sposobnosti da apsorbiraju UV zrake. Najčešće se detektiraju pri 254–280 nm ili 340–360 nm za flavone, flavonole i odgovarajuće glikozide, 520–540 nm za antocijanidine i odgovarajuće glikozide te

250 nm za kromone. Zahvaljujući dobro istraženju strukturi flavonoida i razvoju spektroskopskih metoda, detekcija flavonoida je znatno olakšana. Spektroskopske metode koje se koriste za detekciju su: UV, infracrvena, nuklearno magnetska rezonanca i masena spektroskopija (18).

### 1.7. Kvercetin

Kvercetin je biljni pigment koji djeluje kao jaki antioksidans. Po svome sastavu je flavonol iz skupine flavonoida te se ne može proizvoditi u ljudskom tijelu, a najčešće ga možemo pronaći u grožđu, luku, bobičastom voću, trešnjama, brokuli i agrumima. Visoke koncentracije kvercetina nalaze se u crnom vinu i čaju. Žute je boje i nije topiv u hladnoj vodi, slabo je topiv u toploj vodi, dok je dobro topiv u alkoholu i lipidima. Naziv kvercetin dolazi od latinske riječi „*Quercetum*“ što znači hrastova šuma. Kvercetin je poznat po svome protuupalnom, antihipertenzivnom, protuhiperkolesterolemijskom, protuaterosklerotskom, gastroprotektivnom, protuulkusnom, protualergijskom i protugojaznom djelovanju (15). Kvercetin može zaštititi i od vanjskih uzroka slobodnih radikala, kao što je pušenje. Zaštitu od pušenja kvercetin ostvaraju zaštitom eritrocita od membranskog oštećenja potencijalno uzrokovanog pušenjem (15). Jedno od najbitnijih svojstava kvercetina je sposobnost modulacije upale inhibicijom upalnih COX enzima i lipooksigenaze, čime smanjuje upalne medijatore prostaglandine i leukotrijene (19). U istraživanju García-Mediavilla V i suradnika (20) dokazano je da kvercetin ima sposobnost smanjenja mRNA razine inducibilne sintaze dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*; iNOS), ciklooksigenaze-2 (eng. *cyclooxygenase 2*; COX-2) i ekspresije CRP-a te smanjenja razine iNOS-a, COX-2 i CRP-a pri niskim i srednjim koncentracijama u ljudskim hepatocitima. Ova studija sugerira da modulacija iNOS-a, COX-2 i CRP-a kvercetinom doprinosi protuupalnim učincima putem mehanizama koji uključuju blokadu aktivacije jezgrinog čimbenika kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*; NF-κB). Poznati su brojni korisni učinci kvercetina i ostalih flavonoida na kardiovaskularni sustav (15, 21, 22). U istraživanju Edwards RL i suradnika (21) dokazano je da dnevna konzumacija 730 mg kvercetina tijekom 28 dana smanjuje sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak kod ispitanika koji imaju hipertenziju prvog stupnja, no kod ispitanika s prehipertenzijom nije uočeno smanjenje hipertenzije. U ovome istraživanju nije uočeno smanjenje oksidativnog stresa kvercetinom koje je promatrano pomoću izoprostana u urinu, antioksidativne rezerve plazme (engl. *plasma antioxidant reserve*; PAR) i antioksidativne

moći redukcije feri iona (engl. *ferric reducing antioxidant power*; FRAP). Poznato je da kvercetin sprječava oštećenja uzrokovana LDL kolesterolom te da konzumacija flavonoida smanjuje razinu kolesterola (15). Chopra M i suradnici (22) su u istraživanjima na ljudima dokazali da konzumacija kvercetina i bezalkoholnog ekstrakta crnog vina inhibira oksidaciju LDL-a nakon *in vivo* konzumacije. Kvercetin i drugi flavonoidi ostvaraju brojna neuroprotektivna djelovanja u mozgu, kao što su: zaštita neurona od oštećenja uzrokovanih neurotoksinima, sposobnost suzbijanja upala u moždanom sustavu i potencijal poboljšanja kognitivnih funkcija (23). Vauzour D i suradnici (23) tvrde da kvercetin svoj neuroprotektivan učinak ostvaraju na 2 načina. Prvi način je pomoću interakcije s neuronskim signalnim kaskadama u mozgu, čime dolazi do inhibicije apoptoze te time dolazi do promicanja neuronske diferencijacije i preživljenja. Drugi način neuroprotektivnog učinka kvercetin ostvaruje djelovanjem na periferni i cerebralni vaskularni sustav, što dovodi do pojačanje angiogenze, rasta novih živčanih stanica u hipokampusu i promjena u neuronskoj morfologiji.

## **2. HIPOTEZA**

Bijelo vino sa većim udjelom fenola i flavonoida će izazivati poboljšanu o endotelu-ovisnu dilataciju izoliranih aortnih prstenova u usporedbi s uzorcima vina smanjenog udjela fenola i flavonoida.



### **3. CILJ**

Ispitati vazodilatacijski potencijal i antioksidativni status bijelih vina proizvedenih različitim tehnološkim procesima.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao eksperimentalno istraživanje na izoliranim organima pokusnih laboratorijskih životinja (Sprague-Dawley štakora). Eksperimentalni postupci bili su u skladu sa zakonima koje je propisao Europski parlament i Vijeće o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Direktiva 210/63/EU) te ih je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/22-08/02, Ur. broj: 2158-61-46-22-68). Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

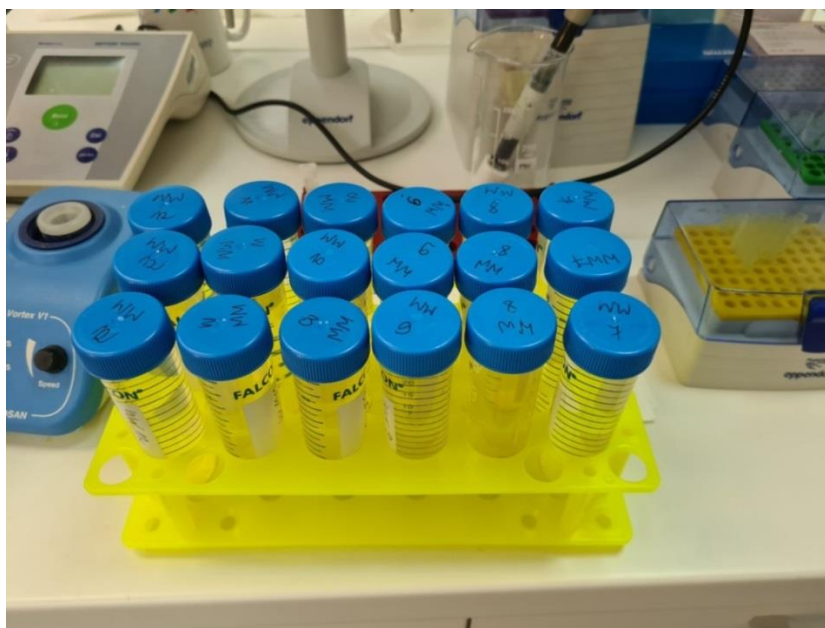
### 4.2. Ispitanici

U znanstvenoistraživačkom radu koristili smo Sprague-Dawley štakore. Svi štakori bili su iz vlastitog uzgoja Vivarija Medicinskog fakulteta u Osijeku. U ovome radu koristili smo ukupno 40 mužjaka Sprague-Dawley štakora u dobi od 9 do 12 tjedana. Štakori su bili smješteni u prostoriji kontrolirane svjetlosti i vlažnosti, temperatura u prostoriji bila je između 21 °C i 23 °C. Štakori su imali slobdan pristup vodi i hranjeni su komercijalno pripremljenom hranom za pelete (Mucedola, Italija). Pokusi su napravljeni na izoliranim aortalnim prstenovima. Kao uzorak za aortalne prstenove koristili smo torakalnu aortu Sprague-Dawley štakora širine 3 do 4 mm. Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/mL, ampule 2 mL, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/mL, 3 mL, Torrex Chiesi Pharma) te je potom napravljena torakotomija, nakon čega smo izvadili torakalnu aortu i odložili je u Petrijevu zdjelicu s 10 mL oksigenirane Krebs – Henseleitove otopine (sastav otopine u mmol/L: 120 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 25,5 NaHCO<sub>3</sub>; 10 glukoza i 0,02 EDTA). Svi eksperimentalni postupci usklađeni su s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (Direktiva 86/609). Poduzete su sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Sva istraživanja je za provedbu odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa: 602-04/22-08/02, Ur. broj: 2158-61-46-22-68).

## 4.3. Metode

### 4.3.1. Uzorci bijelog vina

Uzorci vina su proizvedeni iz ručno branog grožđa graševine (VIVC - br.13217) 2020. godine na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Vino je proizvedeno u pokusnoj postaji za lozu i vino Mandićevac (lat. 45.368428, lon. 18.246395, nadmorska visina 000 m), Hrvatska, podregija Slavonije, među vinogradarskom četvrti Đakova. Vinograd je zasađen 2013. godine te je smješten u tlu koje prelazi iz luvisola u stagnični luvisol. Nakon berbe, grožđe je podvrgnuto različitim tretmanima. U svakom tretmanu moštu je dodatno 25 mg SO<sub>2</sub>/L, a zatim je inokulirano s 250 mg/L Lalvina QA23 (*Saccharomyces cerevisiae*). Proizvedene su 4 skupine vina u triplikatu. Za uzorke vina 10-12, grupa WW<sub>10-12</sub>, provedena je standardna procedura koja zahtijeva da se mošt odvoji od tvrdih dijelova grožđa, bez maceracije, tijekom 12 sati taloženja i s fermentacijom na 25 °C. Druga skupina vina graševine fermentirala je na kožici tijekom 30 dana na 25 °C (uzorci vina 1-3, WW<sub>1-3</sub> grupa). Treća skupina vina je na kožici fermentirala tijekom 15 dana, a ostatak fermentacije proveden je bez kožice (uzorci vina 4-6, WW<sub>4-6</sub> grupa). Četvrta skupina vina provela je 24 sata fermentirajući na kožici pri 4 °C (uzorci vina 7-9, WW<sub>7-9</sub> grupa). Mošt se potom odvojio od kožice te je inokuliran kvascem i fermentiran na 25 °C. Gotova vina sulfirirana su s 25 mg/L SO<sub>2</sub>. Tri mjeseca nakon fermentacija, vina su napunjena u boce te su čuvana na 12 °C do analize.



**Slika 1.** Uzorci bijelog vina (izvor: original autora rada)

### 4.3.2. Nanošenje aortnih prstenova u kupelj

Prvi korak bila je priprema modificirane Krebs – Henseleitove otopine (sastav otopine u mmol/L: 120 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 25,5 NaHCO<sub>3</sub>; 10 glukoza i 0,02 EDTA) dodatkom 800 mL destilirane vode u staklenu posudu u kojoj se nalazi otopina, nakon čega smo izmjerili pH otopine pomoću magnetske miješalice (optimalan pH je između 7,35 i 7,45). Mjerenjem smo dobili pH otopine iznad optimalnog te smo potom dodavali HCl sve dok pH nije pao unutar optimalnih intervala.



**Slika 2.** Magnetska miješalica (izvor: original autora rada)

Nakon pripreme otopine, izolirane aortne prstenove smo smjestili u Petrijevu zdjelicu s 10 mL oksigenirane Krebs – Henseleitove otopine koja je kontinuirano oksigenirana i zagrijavana na 37 °C. Aortne prstenove smo potom izrezali na 4 podjednaka dijela.



**Slika 3.** Izrezani aortni prstenovi u Petrijevoj zdjelici s oksigeniranom Krebs – Henseleitovom otopinom (izvor: original autora rada)

Kroz svaki aortni prsten provukli smo 2 žičana držača.



**Slika 4.** Aortni prsten pričvršćen žičanim držačem (izvor: original autora rada)

Aortne prstenove pričvršćene žičanim držačem smo potom smjestili na nosač, koji je uronjen u tkivnu kupelj (bazenčić).



**Slika 5.** Aortni prsten smješten na nosač (izvor: original autora rada)

### 4.3.3. Ekvilibracija

Nakon što smo aortne prstenove smjestili u tkivne kupelji, napravili smo prekontrakciju na 2 g (20 mN) sile, koju možemo očitati na računalu koje je povezano s aortnim prstenovima u kupelji pomoću izometričnog transducera (pretvarača sile). Ekvilibracija (stabilizacija) je provedena tijekom jednog sata, unutar kojega smo svakih 15 minuta ispirali bazenčić tako što smo ispustili Krebs – Henseleitovu otopinu iz komorice i dodali 10  $\mu$ L svježe Krebs – Henseleitove otopine. Aortni prstenovi su izrazito nestabilni zbog stresa kojeg su doživjeli tijekom pripreme aorte i montiranja na sustav, prilikom čega dolazi do značajnih otklona od postavljene sile prenaprezanja (2 g), zbog toga smo svakih 15 minuta tijekom ekvilibracije zatezali aortne prstenove na 2 g sile. Ekvilibracijom aortnog prstena postigli smo kontinuiranu vrijednost sile.



**Slika 6.** Sustav tkivnih kupelji za izolirane organe (Isolated Organ Bath System)  
(izvor: original autora rada)

#### 4.3.4. Dodavanja noradrenalina i acetilkolina

Nakon ekvilibracije, pripremili smo otopinu noradrenalina (razrjeđivanjem s destiliranom vodom) te smo dodali 100  $\mu\text{L}$  noradrenalina u bazenčić (do završne koncentracije  $10^{-7}$  mol/L). Nakon dodatka noradrenilina, pričekali smo 5 minuta kako bi došlo do kontrakcije krvne žile.

Nakon 5 minuta u bazenčić smo dodali 100  $\mu\text{L}$  otopine acetilkolina, završne koncentracije  $10^{-6}$  mol/L, koju smo pripremili razrjeđivanjem s destiliranom vodom. Nakon dodatka acetilkolina, pričekali smo 2 minute kako bi došlo do dilatacije krvne žile te smo potom proveli tri ispiranja u trajanju od 10 minuta pomoću kojih smo postigli stabilizaciju aortnih prstenova. Mjerenjem vazodilatacijskog odgovora aortnog prstena na acetilkolin, procijenili smo funkciju i intaktnost endotela. Nakon stabilizacije, ponovno smo dodali 100  $\mu\text{L}$  otopine noradrenalina (završne koncentracije  $10^{-7}$  mol/L) u bazenčić te smo pričekali 5 minuta kako bi došlo do kontrakcije krvne žile.

#### 4.3.5. Dodavanje uzoraka bijelog vina

Nakon kontrakcije krvne žile noradrenalinom, u bazenčić smo dodali uzorke vina u kumulativnoj dozi 0,1-8 ‰. Prvi uzorak koji smo dodali imao je volumen 1  $\mu\text{L}$  (0,1 ‰), nakon čega smo pričekali 2 minute te bez ispiranja dodali slijedeći uzorak (10  $\mu\text{L}$ , 10 ‰). Postupak smo ponavljali sve dok nismo dodali sve uzorke (tablica 1.). Nakon svakog uzorka pričekali smo 2 minute.

Prije dodavanja u bazenčiće, vino smo centrifugirali na 1000 okretaja u minuti u periodu od 3 minute.

**Tablica 1.** Uzorci bijelog vina

Redni broj uzorka bijelog vina	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volumen vina u $\mu\text{L}$	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Promili vina (‰)	0,1	1	2	3	4	5	6	7	8

Nakon dodatka uzorka slijedilo je ispiranje pomoću Krebs – Henseleitove otopine u trajanju od 10 minuta, koje smo ponovili 3 puta.

#### 4.3.6. Dodavanje L-NAME

U sljedećoj seriji pokusa, nakon ispiranja i stabilizacije aortnih prstenova, dodali smo 150  $\mu\text{L}$  otopine L-NAME (inhibitor NOS) u završnoj koncentraciji od  $3 \times 10^{-4}$  mol/L. Zatim smo pričekali 10 minuta te smo dodali 100  $\mu\text{L}$  noradrenalina završne koncentracije  $10^{-7}$  mol/L, nakon 5 minuta smo ponovno dodali uzorke bijelog vina u prethodno opisanom redosljedu (tablica 1.) s razmakom od 2 minute između dodavanja uzoraka.



#### **4.3.7. Spektrofotometrijsko određivanje sastava fenola, flavonoida i antioksidativnog statusa**

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola kao standard smo koristili galnu kiselinu, a apsorbancija etanolnih ekstrakta mjerena je na valnoj duljini od 765 nm.

Za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida kao standard smo koristili kvercetin, a apsorbanciju smo mjerili na valnoj duljini od 415 nm.

Za spektrofotometrijsko određivanje antioksidativnog statusa koristili smo 3 metode: DPPH, TBARS i FRAP. Kao standard za DPPH (fluorescentni oporavak nakon izbjeljivanja) metodu smo koristili vitamin C, a apsorbanciju smo mjerili na valnoj duljini od 517 nm. Koncentracija produkata peroksidacije lipida određena je kao količina tvari koje reagiraju s reaktivnim tvarima tiobarbiturne kiseline (TBARS), a spektrofotometrijska očitavanja provedena su na valnoj duljini od 532 i 600 nm. Za FRAP (slobodni radikali 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrata) metodu mjerili smo apsorbanciju iz etanolnih ekstrakta pri valnoj duljini od 593 nm.

Sva spektrofotometrijska mjerenja napravljena su na Varian Cary 50 UV-Vis spektrofotometru (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara , CA, SAD) ) na Fakultetu za agrobiotehničke znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.



**Slika 7.** Varian Cary 50 UV-Vis spektrofotometar (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) (izvor: original autora rada)

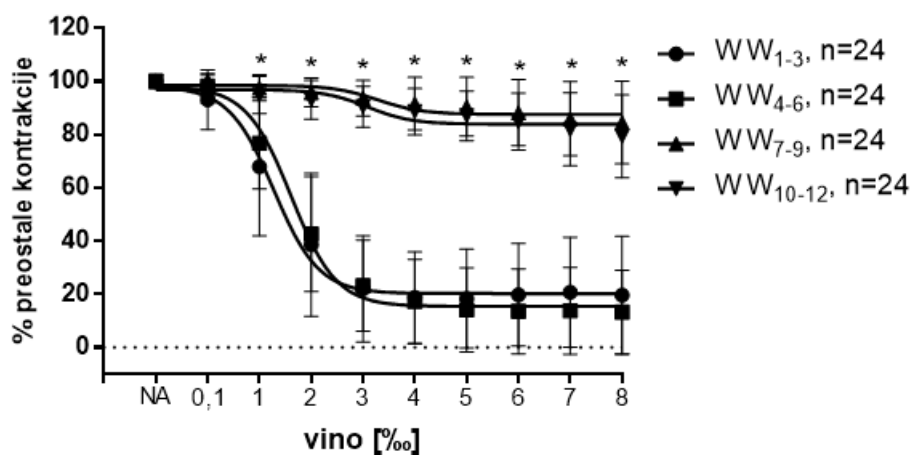
#### 4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Za statističku analizu promjena u vazokonstrikciji i vazodilataciji aortalnih prstenova u kontroliranim uvjetima i pri primjeni agonista koristio sam dvosmjernu analizu varijanci (2-way ANOVA test) s post hoc Bonferoni testom. Za usporedbu rezultata antioksidativnog statusa vina koristio sam test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . Koristio sam statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, SAD) te GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Istraživanja na izoliranim aortnim prstenovima

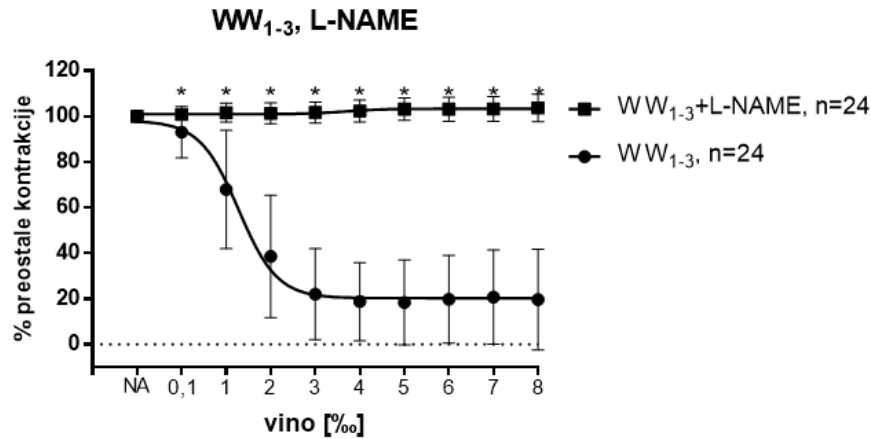
Vazorelaksacija se znatno razlikovala između grupa bijelog vina dobivenih različitim fermentacijskim postupcima. Vazorelaksacija potaknuta bijelim vinom u grupama uzoraka bijelog vina 1-3 (WW<sub>1-3</sub>) i 4-6 (WW<sub>4-6</sub>) bila je znatno jača nego u grupama uzoraka bijelog vina 7-9 (WW<sub>7-9</sub>) i 10-12 (WW<sub>10-12</sub>) (Slika 8.).



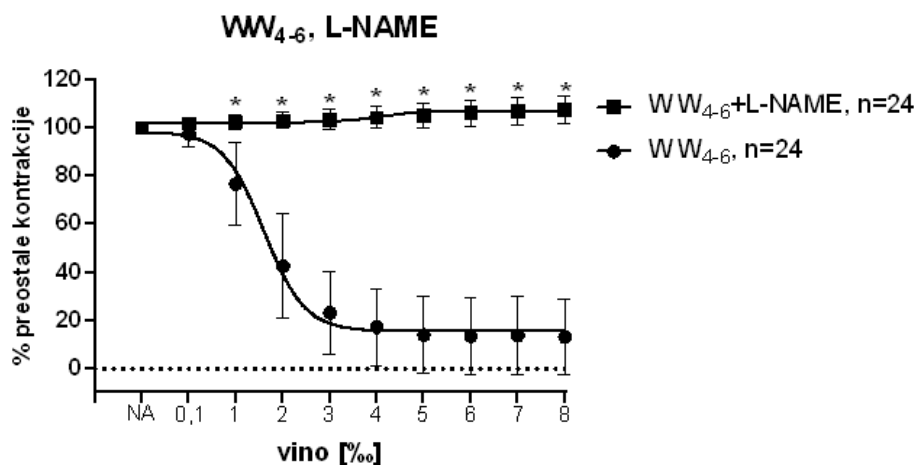
**Slika 8.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>1-3</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 1-3, WW<sub>4-6</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 4-6, WW<sub>7-9</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 7-9, WW<sub>10-12</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 10-12

### 5.2. Predtretman aortnih prstenova s L-NAME

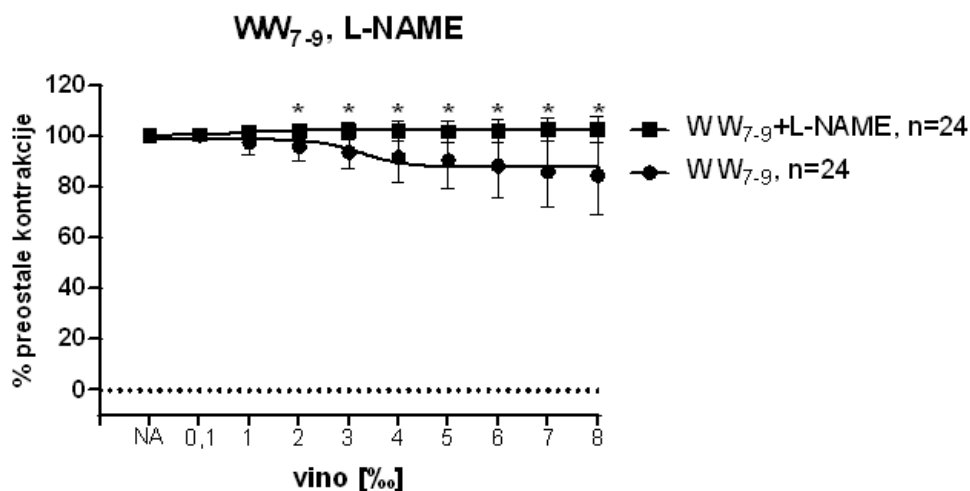
Predtretman aortnih prstenova s L-NAME-om potpuno je poništio vazodilatatorni odgovor na sve uzorke bijelog vina (slike 9.-13.).



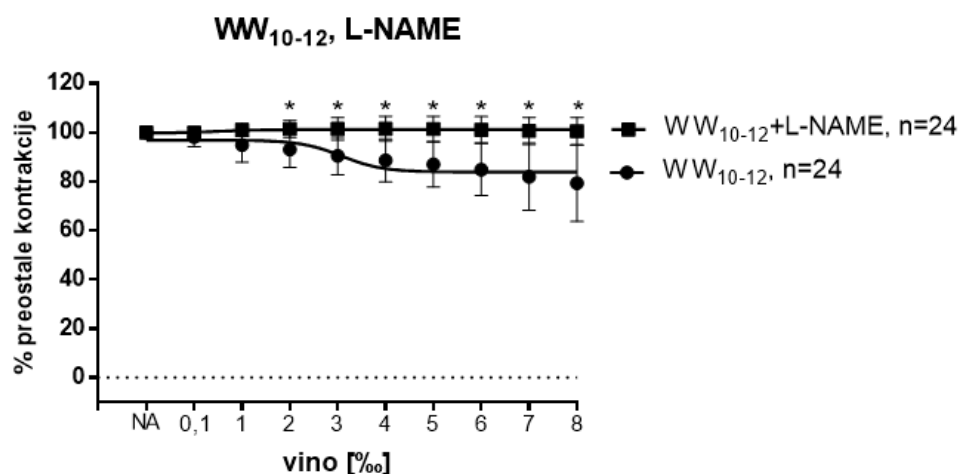
**Slika 9.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L) sa ili bez 300 mol/L L-NAME u skupinama WW<sub>1-3</sub>. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>1-3</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 1-3 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>1-3</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 1-3 bez tretiranja s L-NAME



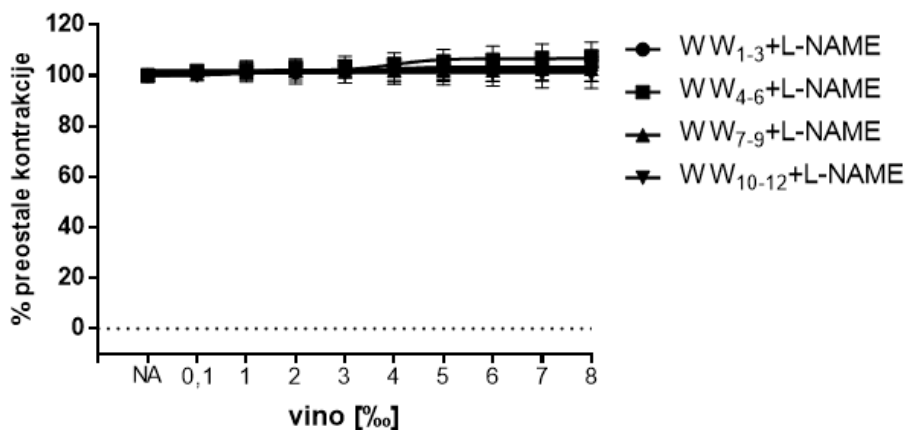
**Slika 10.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L) sa ili bez 300 mol/L L-NAME u skupinama WW<sub>4-6</sub>. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>4-6</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 4-6 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>4-6</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 4-6 bez tretiranja s L-NAME



**Slika 11.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L) sa ili bez 300 mol/L L-NAME u skupinama WW<sub>7-9</sub>. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>7-9</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 7-9 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>7-9</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 7-9 bez tretiranja s L-NAME



**Slika 12.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L) sa ili bez 300 mol/L L-NAME u skupinama WW<sub>10-12</sub>. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>10-12</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 10-12 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>10-12</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 10-12 bez tretiranja s L-NAME



**Slika 13.** Bijelim vinom potaknuta vazodilatacija aortnih prstenova prekontrahiranih noradrenalinom ( $10^{-7}$  mol/L) sa 300 mol/L L-NAME između skupina WW<sub>1-3</sub>, WW<sub>4-6</sub>, WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub>. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija,  $p < 0,05$  - prag statističke značajnosti (ANOVA); n – broj uzoraka, WW<sub>1-3</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 1-3 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>4-6</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 4-6 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>7-9</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 7-9 tretirana s 300 mol/L L-NAME, WW<sub>10-12</sub>+ L-NAME - grupa uzoraka bijelog vina 10-12 tretirana s 300 mol/L L-NAME

### 5.3. Analiza sastava bijelog vina

#### 5.3.1. Biokemijski parametri sastava bijelog vina

U tablici 2. prikazan je biokemijski sastav uzoraka bijelog vina. Alkoholna snaga [vol %] i slobodni sumpor - dioksid [mg/ml] u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> bili su znatno povećani u odnosu na grupe uzoraka WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>. Ukupni suhi ekstrakt [g/l] i pH su bili znatno sniženi u grupama uzoraka WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> u odnosu na grupe uzoraka WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>. Ukupni sumpor - dioksid [mg/l] bio je povišen u grupi uzoraka WW<sub>10-12</sub> u odnosu na ostale grupe uzoraka. Ukupne kiseline [g/l] bile su znatno povećane u grupama uzoraka WW<sub>10-12</sub> i WW<sub>4-6</sub> u odnosu na ostale grupe uzoraka.

**Tablica 2.** Biokemijski parametri bijelog vina

Grupe uzoraka	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	WW <sub>1-3</sub>	WW <sub>4-6</sub>	WW <sub>7-9</sub>	WW <sub>10-12</sub>
Alkoholna snaga [vol %]	13,04 (0,253)	13,13 (0,006)	13,71 (0,045)* <sup>†</sup>	13,72 (0,060)* <sup>†</sup>
Ukupni suhi ekstrakt [g/l]	23,87 (0,568)	23,57 (0,252)	18,73 (0,416)* <sup>†</sup>	18,07 (0,404)* <sup>†</sup>
Slobodni sumpor - dioksid [mg/l]	12,69 (5,143)	11,73 (3,844)	75,41 (4,345)* <sup>†</sup>	53,33 (4,052)* <sup>†‡</sup>
Ukupni sumpor - dioksid [mg/l]	128,00 (7,212)	131,50 (6,841)	126,30 (4,541)	196,40 (3,221)* <sup>†‡</sup>
Hlapljive kiseline [g/l]	0,70 (0,021)	0,65 (0,042)	0,81 (0,026)* <sup>†</sup>	0,66 (0,017) <sup>†‡</sup>
Ukupne kiseline [g/l]	4,87 (0,130) <sup>†</sup>	5,28 (0,112)*	4,80 (0,075)* <sup>†</sup>	6,20 (0,173)* <sup>†‡</sup>
pH	3,73 (0,0265) <sup>†</sup>	3,60 (0,020)*	3,51 (0,045)* <sup>†</sup>	2,92 (0,030)* <sup>†‡</sup>

p < 0,05 - prag statističke značajnosti (ANOVA)

WW<sub>1-3</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 1-3

WW<sub>4-6</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 4-6

WW<sub>7-9</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 7-9

WW<sub>10-12</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 10-12

\* - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>1-3</sub>

<sup>†</sup> - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>4-6</sub>

<sup>‡</sup> - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>7-9</sub>

### 5.3.2. Ukupni sadržaj fenola uzoraka bijelog vina

U tablici 3. prikazan je sadržaj fenola i flavonoida u uzorcima bijelog vina. Sadržaj fenola [mg galne kiseline g-1 FW] i flavonoida [µg kvercetin g-1 FW] u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> znatno je snižen u usporedbi s grupama uzoraka WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>.

**Tablica 3.** Sadržaj fenola i flavonoida u bijelom vinu

Grupe uzoraka	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	WW <sub>1-3</sub>	WW <sub>4-6</sub>	WW <sub>7-9</sub>	WW <sub>10-12</sub>
Sadržaj fenola [mg galne kiseline g-1 FW]	1,17 (0,107) <sup>†</sup>	0,81 (0,017)*	0,27 (0,011)* <sup>†</sup>	0,28 (0,004)* <sup>†</sup>
Sadržaj flavonoida [μg kvercetina g-1 FW]	24,07 (1,066)	25,18 (1,258)	16,53 (1,478)* <sup>†</sup>	14,98 (1,434)* <sup>†</sup>

p < 0,05 - prag statističke značajnosti (ANOVA)

WW<sub>1-3</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 1-3

WW<sub>4-6</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 4-6

WW<sub>7-9</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 7-9

WW<sub>10-12</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 10-12

\* - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>1-3</sub>

† - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>4-6</sub>

### 5.3.3. Antioksidativni kapacitet bijelog vina

U tablici 4. prikazan je antioksidativni kapacitet bijelog vina koji se procijenjuje pomoću metode fluorescentnog oporavaka nakon izbjeljivanja (FRAP), metode reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) i metode slobodnih radikala 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrata (DPPH). FRAP u ekvivalentima željeza (Fe) (II) [mM g-1 FW] i TBARS [nmol g-1 FW] bili su znatno sniženi u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> u odnosu na grupe uzoraka WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>. DPPH 50 % EC [mg FW/ml] je bio znatno povišen u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> u odnosu na grupe uzoraka WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>.



**Tablica 4.** Antioksidativni kapacitet bijelog vina

Grupe uzoraka	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	WW <sub>1-3</sub>	WW <sub>4-6</sub>	WW <sub>7-9</sub>	WW <sub>10-12</sub>
FRAP u ekvivalentima Fe (II) [mM/g FW]	119,30 (18,17) <sup>†</sup>	74,29 (3,003)*	32,93 (1,283)* <sup>†</sup>	29,56 (1,836)* <sup>†</sup>
TBARS [nmol/g FW]	13,84 (1,307) <sup>†</sup>	9,85 (1,419)*	1,47 (0,014)* <sup>†</sup>	2,79 (0,303)* <sup>†</sup>
DPPH 50 % EC [mg FW/ml]	10,65 (1,791)	16,97 (0,7992)	56,93 (9,138)* <sup>†</sup>	59,25 (2,415)* <sup>†</sup>

p < 0,05 - prag statističke značajnosti (ANOVA)

WW<sub>1-3</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 1-3

WW<sub>4-6</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 4-6

WW<sub>7-9</sub> – grupa uzoraka bijelog vina 7-9

WW<sub>10-12</sub> - grupa uzoraka bijelog vina 10-12

\* - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>1-3</sub>

† - p < 0,05 u usporedbi s WW<sub>4-6</sub>

FRAP – metoda fluorescentnog oporavak nakon izbjeljivanja

TBARS – metoda reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline

DPPH – metoda slobodnih radikala 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat

## 6. RASPRAVA

Najvažnije svojstvo endotela je sposobnost vazodilatacije krvnih žila kao odgovor na žilni stres, a u slučajevima oštećenog endotela dolazi do endotelne disfunkcije (1). Prethodna istraživanja (4, 5) pokazala su kako komercijalno dostupna bijela vina imaju znatno slabiju sposobnost vazodilatacije i znatno niži udio polifenola u odnosu na crna vina. U našem istraživanju dokazano je kako vazorelaksacija potaknuta bijelim vinom ovisi o uzorku (postupku proizvodnje) i dozi bijelog vina. Vazorelaksacija potaknuta bijelim vinom bila je, u odnosu na grupu uzoraka bijelog vina dobivenih standardnim postupkom i grupu u kojima je vino dobiveno hlađenjem masulja, znatno jača u grupama uzoraka bijelog vina dobivenih postupkom produžene maceracije.

U istraživanju Fitzpatricka i suradnika (4) dokazano je kako je vazorelaksacija izazvana produktima grožđa posredovana cGMP-NO putem, što može dovesti do smanjenja incidencije koronarne bolesti. Ha SK i suradnici u svom istraživanju (2) dokazali su kako vazorelaksacijsko svojstvo dealkoholiziranog vina ovisi o endotelu zbog endotelne sposobnosti otpuštanja EDRF-a, čiji je predstavnik NO. NO nastaje metabolizmom L-arginina, NO sintetizirano u endotelnim stanicama te sudjeluje u opuštanju vaskularnih glatkih mišića, ali ostvaruje i brojna druga svojstva: adhezija i migracija leukocita u arterijsku stijenku, sprječavanje agregacije trombocita i inhibicija proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica (1). NO također ima bitnu ulogu u staničnoj signalizaciji, a sudjeluje i u regulaciji napetosti kisika u kontroli ventilacije i proizvodnji eritropoetina (13). Prethodno istraživanje (1) pokazalo je kako se NO otpušta iz endotelnih stanica kao odgovor na žilni stres pod djelovanjem spojeva kao što su: acetilkolin, trombin i bradikinin. U našem istraživanju dokazano je kako predtretman aortalnih prstenova s L-NAME-om, inhibitorom NO sintaze potpuno poništio vazodilatatorni odgovor na sve uzorke bijelog vina. Ovime smo dokazali i ulogu NO-a u vazorelaksacijskom odgovoru na bijelo vino.

U istraživanju Flesch M i suradnika (3) dokazano je kako vina ostvaruju koristan učinak zahvaljujući svojim vazodilatatornim svojstvima (3). Na osnovu prethodnog istraživanja (4), zaključeno je da bijela vina sadrže vazodilatatorske tvari, čija koncentracija ovisi o vrsti grožđa korištenom za dobivanje vina te o postupcima s grožđem prije fermentacije. Flavonoidi su fitokemikalije biljnog porijekla čija je najbitnija karakteristika jaka kemijska reaktivnost pomoću koje ostvaruju antioksidativne učinke (18). Naši rezultati su pokazali

kako je sadržaj fenola i flavonoida u grupama uzoraka bijelog vina dobivenih standardnim postupcima i grupama u kojima je vino dobiveno hlađenjem masulja, znatno niži u odnosu na grupe uzoraka bijelog vina dobivenih eksperimentalnim postupcima.

Eksperimentalne studije (10, 16) su pokazale kako je glavni razlog kardioprotektivnog učinka crnog vina prisutnost velikog broja polifenolnih spojeva koji imaju antioksidativna i protuupalna svojstva, pomoću kojih ostvaraju kardioprotektivni učinak. U našem istraživanju dokazan je znatno sniženi antioksidativni kapacitet bijelog vina u skupinama uzoraka bijelog vina dobivenih standardnim postupcima i grupama u kojima je vino dobiveno hlađenjem masulja u odnosu na grupe vina dobivene drugim eksperimentalnim postupcima. Ovime smo dokazali i kako povećanje sadržaja polifenola povećava antioksidativni kapacitet. U našem istraživanju FRAP vrijednost je rasla produljenjem trajanja maceracije (najviša razina bila je u skupini u kojoj je maceracija trajala 30 dana, skupina WW<sub>1-3</sub>), prilikom čega se povećao i antioksidativni status vina. DPPH 50 % EC vrijednost padala je s produljenjem trajanja maceracije (najviša vrijednost bila je u skupini bez maceracije, u vinima dobivenim standardnim postupcima, skupina WW<sub>10-12</sub>). DPPH 50 % EC i FRAP metode su obrnuto proporcionalne te smo mjerenjem DPPH 50 % EC potvrdili kako se antioksidativni status vina povećava produljenjem trajanja maceracije. TBARS vrijednosti su pokazale kako povećanjem trajanja maceracije dolazi do povećanja sadržaja produkata peroksidacije lipida (najviša razina bila je u skupini u kojoj je maceracija trajala 30 dana, skupina WW<sub>1-3</sub>).

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ovisno o povećanom i/ili očuvanom sadržaju kvercetina, rezultati pokazuju bijelim vinom potaknutu vazorelaksaciju kao ovisnu o NO i sugeriraju mogućnost povećanja vazorelaksacijskog potencijala bijelog vina korištenjem različitih postupaka proizvodnje.
- Tehnologija prerade bijelog vina, koja uključuje maceraciju, značajno pridonosi povećanju sadržaja poželjnih kemijskih spojeva i antioksidativnog kapaciteta u vinu.
- Maceraciju, kao nužan postupak u proizvodnji crnog vina, treba pažljivo dozirati u proizvodnji bijelog vina kako bi se postigao znatno veći sadržaj poželjnih kemijskih spojeva u odnosu na vina dobivena standardnom tehnologijom, ali izbjegli neželjeni okusi i arome vina.
- Za donošenje zaključka o antioksidativnom učinku, potrebno je provesti *in vivo* eksperimente.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati vazodilatacijski potencijal i antioksidativni status bijelih vina proizvedenih različitim tehnološkim procesima.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija na izoliranim organima laboratorijskih životinja.

**Ispitanici i metode:** Kao uzorak za aortalne prstenove koristili smo torakalna aortu Sprague-Dawley štakora. Nakon izolacije, aortu smo odložili u Petrijevu zdjelicu s oksigeniranom Krebs – Henseleitovom otopinom. Aortu smo potom smjestili u sustav tkivnih kupelji za izolirane organe te nakon sat vremena stabilizacije dodali noradrenalin i acetilkolin. Nakon ispiranja dodali smo uzorke bijelog vina u kumulativnoj dozi 0,1-8 %.

**Rezultati:** Vazorelaksacija u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub> bila je znatno jača nego u grupama uzoraka bijelog vina WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub>. Predtretman aortalnih prstenova s L-NAME-om potpuno je poništio vazodilatatorni odgovor na sve uzorke bijelog vina. Sadržaj fenola i flavonoida u grupama uzoraka WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> znatno je snižen u usporedbi s grupama WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>. FRAP i TBARS su bili znatno sniženi u grupama WW<sub>7-9</sub> i WW<sub>10-12</sub> u odnosu na grupe WW<sub>1-3</sub> i WW<sub>4-6</sub>, dok je DPPH 50 % EC bio znatno povišen.

**Zaključak:** Rezultati pokazuju da je bijelim vinom potaknuta vazorelaksacija ovisna o NO i upućuju na mogućnost povećanja antioksidativnog kapaciteta i vazodilatacijskog potencijala bijelog vina korištenjem različitih postupaka proizvodnje, ovisno o sadržaju kvercetina.

**Ključne riječi:** fenoli; flavonoidi; spektrofotometrija; štakori; torakalna aorta; vazorelaksacija; vino

## 9. SUMMARY

### **White wine - induced endothelium-dependent vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats**

**Objectives:** The main goal of this study was to examine the vasodilatory potential and antioxidant status of white wines produced by different technological processes.

**Study Design:** Experimental study on isolated organs of laboratory animals.

**Participants and methods:** Sprague-Dawley rat thoracic aorta was used as a sample for aortic rings. After isolation, the aorta was placed in a Petri dish with oxygenated Krebs - Henseleit solution. The aorta was placed in a tissue bath system for isolated organs and noradrenaline and acetylcholine were added after one hour of stabilization. After rinsing, we added samples of white wine in cumulative doses 0.1-8 %.

**Results:** Vasorelaxation in groups of wine samples WW<sub>1-3</sub> and WW<sub>4-6</sub> was much stronger than that of WW<sub>7-9</sub> and WW<sub>10-12</sub> groups. Pretreatment of the aortic rings with L-NAME completely abolished vasodilator response to all white wine samples. Phenol and flavonoid content in WW<sub>7-9</sub> and WW<sub>10-12</sub> groups of wine samples compared to WW<sub>1-3</sub> and WW<sub>4-6</sub> groups were significantly decreased. FRAP and TBARS were significantly decreased in WW<sub>7-9</sub> and WW<sub>10-12</sub> groups of wine samples compared to WW<sub>1-3</sub> and WW<sub>4-6</sub> groups, and DPPH 50 % EC was significantly increased.

**Conclusion:** The results show that white wine induced vasorelaxation is NO-dependent and suggest the possibility of increasing the antioxidant capacity and vasodilatory potential of white wine using different production methods, depending on the quercetin content.

**Key words:** phenol; flavonoids; spectrophotometry; rats; thoracic aorta; vasorelaxation; wine

**10. LITERATURA**

1. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Mihaljević Z, Drenjančević I, Manojlović D, i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski vjesnik*. 2012; 44 ((1-4)), 135-146.
2. Ha SK, Park HY, Ryu MR, Kim Y, Park Y. Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effects of Dealcoholized Wine Powder of Wild Grape (*Vitis coignetiae*) in the Rat Thoracic Aorta. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; 6846084.
3. Flesch M, Schwarz A, Böhm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol*. 1998; 275(4):H1183-90.
4. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*. 1993; 265:H774-H778.
5. Boban M, Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Salamunic I, i sur. Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47:695-701.
6. Torres A, Cachofeiro V, Millán J, Lahera V, Nieto M, Martín R, i sur. Red wine intake but not other alcoholic beverages increases total antioxidant capacity and improves pro-inflammatory profile after an oral fat diet in healthy volunteers. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2015; 215(9):486-94.
7. Piano MR. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res*. 2017;38(2):219-241.
8. Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Alcohol and mortality. *Ann Intern Med*. 1992; 117(8):646-54.
9. Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, i sur. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet*. 1991; 338(8765):464-8.
10. Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Di Minno G, i sur. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*. 2019; 24(19):3626.
11. Lang CH, Frost RA, Summer AD, Vary TC. Molecular mechanisms responsible for alcohol-induced myopathy in skeletal muscle and heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(10):2180-95.

12. Vu KN, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Nambi V, Volcik KA, Boerwinkle E, i sur. Causal role of alcohol consumption in an improved lipid profile: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0148765.
13. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2):89-96.
14. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada: Zagreb; 2009. Poglavlje 14 Hormoni (str. 360-363).
15. Parasuraman S, David AVA, Arulmoli R. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev*. 2016, 10, 84-89.
16. Gonzalez-Sarrias A, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects, *Trends Food Sci. Technol.*, 2017; 69, 281-28.
17. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr*. 2015; 54(3):325-41.
18. Feng W, Hao Z, Li M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids; Justino, G.C., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 17-43.
19. Xiao X, Shi D, Liu L, Wang J, Xie X, Kang T, i sur. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS One*. 2011; 6(8):e22934.
20. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, i sur. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*. 2007; 557(2-3):221-9.
21. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Robovsky A, Symons JD, Jalilli T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr*. 2007; 137(11):2405-11.
22. Chopra M, Fitzsimons PE, Strain JJ, Thurnham DI, Howard AN. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin Chem*. 2000; 46(8 Pt 1):1162-70.
23. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JPE. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*. 2008; 3(3-4):115-26.



## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Stefan Stepančević

Datum i mjesto rođenja: 17. 9. 1998. Vukovar, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Ulica grada Vukovara 24, Mohovo, Republika Hrvatska

Mobitel: 0958407007

E-mail adresa: sstepancevic@mefos.hr

Obrazovanje: 2013.-2017. pohađao opću gimnaziju u Srednjoj školi Ilok

2017.-2020. pohađao Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2020.-2022. pohađao Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku